

Lysophosphatidylcholine stimulates the expression and production of MCP-1 by human vascular endothelial cells

著者	高原 典子
発行年	1996-03-22
その他の言語のタイトル	リゾフォスファチジルコリンはヒト血管内皮細胞からの単球走化性因子の産生を促進する リゾフォスファチジルコリン ハ ヒト ケツカン ナイヒ サイボウ カラノ タンキュウ ソウカセイ インシ ノ サンセイ ヲ ソクシンスル
URL	http://hdl.handle.net/10422/2331

氏名・（本籍）	高 原 典 子（広島県）
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	博士第223号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成8年3月22日
学位論文題目	Lysophosphatidylcholine stimulates the expression and production of MCP-1 by human vascular endothelial cells (リゾフォスファチジルコリンはヒト血管内皮細胞からの単球走化性因子の産生を促進する)

審査委員	主査 教授 挟 間 章 忠
	副査 教授 戸 田 昇
	副査 教授 吉 川 隆 一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

単球走化性因子（Monocyte chemoattractant protein-1；MCP-1）は、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、マクロファージなどより分泌されるサイトカインの一種であり、単球に対して特異的に遊走を促進する。MCP-1は粥状硬化巣に強く発現していることより、動脈硬化症の発症に重要な役割を担っていると考えられている。一方、低比重リポ蛋白（LDL）は生体内で酸化変性され、血管内皮細胞の機能異常を引き起こすことが報告されている。そこで、培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）を用いて、酸化LDLの主要構成成分であるlysophosphatidylcholine（LPC）がヒト血管内皮細胞のMCP-1遺伝子発現および蛋白の産生、分泌を促進するか否かについて検討した。また、MCP-1遺伝子の発現に関与するシグナル伝達系についても検討した。

〔方 法〕

- 1 ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の培養法；ヒト臍帯静脈より酵素法により臍帯静脈血管内皮細胞を採取し、コラーゲン塗布培養皿上で10%牛胎児血清、50 μ g/ml 内皮細胞増殖因子、90 μ g/ml ヘパリン添加 minimal essential medium にて培養した。実験には6継代までのものを使用した。
- 2 MCP-1 cDNA のクローニング；HUVEC より acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 法により total RNA を抽出し、RT-PCR 法により MCP-1 cDNA をクローニングした。
- 3 ノーザンブロット法；各20 μ gの total RNA を1%アガロースゲルにて電気泳動し、ナイトランメンブランにトランスファーした。ヒト MCP-1 cDNA を [α - 32 P] dCTP でラベリングし、hybridization buffer（0.5% NaHPO₄、1%牛血清アルブミン、1mM EDTA、7% SDS）で65℃ overnight ハイブリダイズした。洗浄後、autoradiography によりシグナルを検出した。
- 4 ELISA法による MCP-1 蛋白の定量；各条件下に細胞を24時間孵置した後、その培養液を回収し、培養液中の MCP-1 蛋白量を抗ヒト MCP-1 抗体を用いたサンドイッチELISA法により定量した。

〔結 果〕

- 1 非刺激時のHUVECにおいてヒト MCP-1 mRNA の発現を認めた。
- 2 50 μ M LPC 刺激によりヒト MCP-1 mRNA レベルは刺激6時間後にピークとなり、以後すみやかに減少し、24時間後には非刺激時とほぼ同レベルとなった。
- 3 MCP-1 mRNA レベルは、0-50 μ M LPC の刺激で濃度依存性に増加し、50 μ M LPC の刺激により基礎値の6.0 \pm 1.9倍と有意に増加した。

- 4 非刺激時のHUVECにおいて MCP-1 蛋白の産生、分泌を認めた (15.2 ± 0.3 ng / 24h / mg cellular protein)。また、 $50 \mu\text{M}$ LPC 刺激により MCP-1 蛋白の産生、分泌は有意に増加した。 (20.9 ± 0.5 ng / 24h / mg cellular protein)。
- 5 $50 \mu\text{M}$ phosphatidylcholine (PC)、lysophosphatidylethanolamine (LPE) の刺激により、MCP-1 蛋白の産生、分泌は増加しなかった。
- 6 $50 \mu\text{M}$ LPC 刺激によるヒト MCP-1 mRNA レベルの増加は、 0.2 nM staurosporine 共孵置により $53 \pm 7\%$ 抑制された。

[考 察]

LPC刺激により培養ヒト血管内皮細胞の MCP-1 遺伝子発現が増強することを示した。健康者の血清中のLPC含量は $143 \pm 22 \mu\text{mol Pi/l}$ であり、このLPC含量は種々の病態により変化する。例えば、インスリン非依存型糖尿病患者では血清LPC濃度の上昇が認められ、また動脈硬化症の血管組織中のLPC含量は正常血管に比し約8倍高値であると報告されている。これらのことより、血清あるいは組織中で増加したLPCが血管内皮細胞の MCP-1 遺伝子の発現を増強し、動脈硬化症の発症に関与する可能性が示唆される。さらに、 $50 \mu\text{M}$ LPC 刺激により HUVECの MCP-1 蛋白の産生が有意に増加した。これらの現象はPCやLPEには認められず、LPCに特異的であった。また、プロテインキナーゼC (PKC) 阻害剤を用いた実験より、LPCによる MCP-1 遺伝子発現には、PKCの活性化を介する経路が関与すると考えられた。

[結 論]

LPCはヒト血管内皮細胞の MCP-1 mRNA 量を増加し、MCP-1 蛋白の産生、分泌を促進することにより、動脈硬化症の発症に関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

低比重リポ蛋白 (LDL) は、糖尿病などの病的状態において酸化変性を受け、血管内皮細胞の機能異常を引き起こす可能性が示唆されている。しかし、酸化変性LDL中のいずれの構成成分が、どのような機構を介して血管内皮細胞の機能を修飾するかについては必ずしも明かではない。本論文は、酸化変性LDLの主要構成成分である lysophosphatidylcholine (LPC) の血管内皮細胞機能に対する作用を明確にする目的で、血管内皮細胞の単球走化性因子 (monocyte chemoattractant protein-1 ; MCP-1) の発現を検討したものである。

本論文では、

- 1) 培養ヒト血管内皮細胞に、MCP-1 遺伝子の発現を認めること、
- 2) LPCが MCP-1 遺伝子の発現および MCP-1 蛋白の産生分泌を促進すること、
- 3) LPCがプロテインキナーゼCの活性化を介して MCP-1 遺伝子の発現を促進することを確認した。

以上の結果により、酸化変性LDLの主要構成成分であるLPCは、培養ヒト血管内皮細胞の MCP-1 遺伝子発現を促進し、MCP-1 蛋白の産生分泌を促進することが強く示唆される。MCP-1 は、動脈硬化病変部位に強く発現し、単球の走化性を特異的に促進することより、その動脈硬化の発症における役割が注目される。

本論文は、酸化変性LDLの血管内皮細胞障害作用の新しい機構を明かにしたものであり、博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。